

А.З. Пепоян

Структурные изменения клеточных стенок и рост УФ-чувствительных штаммов *Salmonella derby* в зависимости от кислотности среды

(Представлено академиком К.Г. Карагезяном 30/IV 2001)

Возможная взаимосвязь между структурой мембран и физиологией клетки является одной из важнейших проблем молекулярной биологии. Известно, что для нормального метаболического статуса бактериальных клеток необходим сравнительно устойчивый уровень цитоплазматического рН, в основном регулирующийся с помощью H^+ -связанных транспортных систем [1-3]. Известно также, что переход культуры из логарифмической фазы роста в стационарную в бактериальных суспензиях определяется главным образом их межклеточными взаимодействиями [4-6] и для достижения стационарной фазы роста бактерий играют роль также изменение кислотности среды культивирования и ее обновление метаболитами. По имеющимся данным, присутствие в клетках R-плазмиды может оказывать существенное влияние на рост, размножение и сохранение бактериальных клеток *S. derby* [7].

Целью настоящей работы явилось изучение влияния кислотности среды на выживаемость клеток и структурной организации клеточных стенок штаммов *S. derby* в зависимости от УФ-чувствительности и отсутствия в них R-плазмиды.

В опытах использовали условно-патогенный УФ-чувствительный штамм *S. derby* K89 и его УФ-резистентный бесплазмидный вариант *S. derby* K82. В качестве питательных сред для выращивания бактериальных культур брали минимальную среду роста бактериальных культур М-9 [8] и 2%-ный мясопептонный агар.

Таблица 1

Влияние рН среды культивирования на рост и размножение клеток *S. derby*

Штаммы	Выживаемость, %					
	рН среды культивирования					
	5.02	5.5	6.5	7	7.5	8
<i>S. derby</i> K89, лог. фаза	32	64.38	79	82.94	100	90
<i>S. derby</i> K89	100	62	61.2	59.4	55.3	40
<i>S. derby</i> K82, лог. фаза	44.06	73	89.27	97.74	100	70.06
<i>S. derby</i> K82	77	98	100	94.7	74.5	50.91

Таблица 2

Относительная скорость роста клеток *S. derby* в зависимости от кислотности среды

Инкубационный период, ч	Относительная скорость роста, μ (бесплазмидные клетки)					
	<i>pH</i> среды культивирования					
	5.02	5.5	6.5	7	7.5	8
3.5	1.3	1.58	1.52	1.52	1.51	1.107
5	5.2	2.26	2.25	2.25	2.01	1.72
6.5	1.3	1.84	1.63	1.57	1.33	1.32
Ночная культура	28	14.21	11.42	10.8	7.03	4.29
Инкубационный период, ч	Относительная скорость роста, μ (плазмидные клетки)					
	<i>pH</i> среды культивирования					
	5.02	5.5	6.5	7	7.5	8
3.5	4	6.52	5.4	4.8	4.8	4.8
5	3	1.65	1.57	1.8	1.3	1.3
6.5	1.46	1.38	1.54	1.06	1.23	1.18
Ночная культура	75	37.2	24.81	20.72	15.64	12.77

Таблица 3

Относительный рост кислотности среды ночных клеток *S. derby*

Первоначальный <i>pH</i> среды культивирования	Относительная скорость роста, μ	
	<i>S. derby</i> K89	<i>S. derby</i> K82
4.9	1.19	1.04
7.1	1.17	1.03

Штаммы *S. derby* выращивали при аэробных условиях с разными *pH* (от 5.02 до 8.0) среды культивирования. Концентрацию клеток устанавливали в определенные моменты (2, 3.5, 5, 6.5 ч) инкубационного времени с помощью ФЭК при длине волны 540 нм (светофильтр N 6) с кюветами толщиной 10 мм. В качестве основного экспериментального метода для изучения структуры мембранных суспензий служил метод дифракции рентгеновских лучей под малыми и большими углами [9]. Выделение клеточных стенок из штаммов *S. derby* проводилось известным способом [10] с соответствующей обработкой [7]. Данные о влиянии *pH* среды на рост и размножение клеток *S. derby* приведены в табл. 1-3. Из табл. 1 явствует, что для клеток *S. derby*, как плазмидных, так и бесплазмидных, в логарифмической фазе роста оптимальный *pH* наблюдается при значениях от 7.0 до 7.5. Изменение *pH* среды культивирования обоих штаммов не влияет на время достижения стационарной фазы (табл. 2). Показано, что переход плазмидных клеток *S. derby* K89 из логарифмической в стационарную фазу роста завершается через 2.5-3.0 ч после инкубации, а переход бесплазмидных клеток *S. derby* K82 - в 1.5 раза позже. Максимальная скорость роста наблюдается для клеток *S. derby*, находящихся в инкубационной среде со

сравнительно низкими значениями pH окружающей среды.

В табл. 1 показана зависимость роста ночных клеток *S. derby* от первоначальных значений pH инкубационной среды. Как видно из таблицы, после перехода клеток в стационарную фазу наблюдается изменение интенсивности роста в зависимости от pH среды со сдвигом в кислую сторону (максимум роста для ночных бесплазмидных клеток наблюдается при pH 6.5, а для плазмидных клеток при pH 5.02). В табл. 2 приведены данные по определению изменений относительных скоростей роста pH среды культивирования при росте плазмидных и бесплазмидных клеток *S. derby*. Как явствует из данных табл. 3, при росте штаммов *S. derby* происходит изменение кислотности инкубационной среды, что, по всей вероятности, может являться одним из факторов контролирования процессов выживаемости бактерий.

Учитывая, что на рентгенограммах появление рефлекса с межплоскостным расстоянием $4.3\text{\AA}$ во время рентгенографического анализа характеризует состояние углеводородных цепочек молекул фосфолипидов в мембране, мы исследовали физикохимическое состояние углеводородных цепочек фосфолипидов клеточных стенок при дифракции рентгеновских лучей под большими углами. При $4.3\text{\AA}$ рефлексы для клеток *S. derby* отсутствуют. Это, по всей вероятности, объясняется жидким состоянием фосфолипидов мембран обоих типов клеток *S. derby*. В случае мембран плазмидных клеток (pH 7) при 8 и $11\text{\AA}$ возникают два четко выраженных рефлекса, имеющих форму окружности. Для мембранных суспензий, полученных из бесплазмидных клеток, во всех исследуемых значениях pH (pH 2–10), а также для мембран плазмидных клеток в сильно кислой и щелочной среде указанные рефлексы отсутствуют.

Ранее нами было показано [11, 12], что основными фосфолипидами клеточных стенок *S. derby* являются фосфатидилхолины (ФХ) (с длиной полярных головок $11\text{\AA}$) и фосфатидилэтаноламина (ФЭ) (с длиной полярных головок $8\text{\AA}$). По всей вероятности, в случае плазмидных клеток *S. derby* K89 имеем дело с эквидистантным расположением полярных групп молекул ФЭ и ФХ на поверхности мембран, что может стать причиной возникновения рефлексов при 8 и $11\text{\AA}$ в рентгенограммах из суспензии мембран плазмидных клеток.

Как явствует из проведенных экспериментов, при нейтральных значениях суспензии мембраны имеют более упорядоченное внутримембранное состояние. С другой стороны, увеличение гидрофильности молекул фосфолипида или мембран должно привести к увеличению взаимодействия мембран с водой и в конечном счете - к увеличению количества молекул воды в мембранном пространстве, вызывая увеличение межплоскостного расстояния малоугловых рефлексов.

Действительно, как в кислой (pH 2.5), так и щелочной (pH 10.9) среде имеет место увеличение межплоскостных расстояний малоугловых рефлексов при рентгенографических исследованиях, что указывает на увеличение толщины межмембранной водной прослойки.

Интересно сравнить результаты рентгеновских исследований с данными по изучению влияния кислотности на выживаемость плазмидных и бесплазмидных клеток *S. derby*.

Как отмечалось выше, мембраны клеток *S. derby* находятся в наиболее упорядоченном состоянии при pH 7–7.5. Изменение кислотности среды, по-видимому, влияет на гидрофильно-гидрофобные взаимодействия молекул фосфолипидов в мембранах, способствуя изменению межклеточных взаимоотношений. С другой стороны, изменение внутримембранных состояний (табл.3) имеет решающее значение в регуляции активности мембранных протеинов, а также для метаболического статуса клетки в целом.

Таким образом, направленность кинетики влияния pH окружающей среды как для плазмидных, так и бесплазмидных клеток *S. derby* одинакова. Однако отсутствие R-плазмиды воздействует на кинетические параметры роста и размножения, приводя к замедлению метаболизма бесплазмидных штаммов *S. derby*.

Обнаружена корреляция между отсутствием в клетках R-плазмиды и кинетическими параметрами роста и размножения клеток УФ-чувствительных и УФ-резистентных штаммов *S. derby* и выявлена роль R-плазмиды в формировании структурной организации клеток *S. derby*.

Изменение кинетических параметров роста и размножения при изменении кислотности среды, по всей вероятности, обусловлено также изменением гидрофильно-гидрофобных взаимоотношений в мембранах *S. derby*.

Институт молекулярной биологии НАН РА

Литература

1. *Kakinuma Y.* - Biol. Reviews. 1998. Dec. P.1021-1045.
2. *Mugikura S., Ntashikawa M., Igarashi K., Kobayasi H.* - J. Biochem. 1990. V.108, P.89-91.
3. *Trchounian A., Ohanjanayan E., Zakaryan E.* - Memb. Cell. Biol. 1998. V.12 N 1, P. 67-78.
4. *Конев С.В., Янгевская Т.К., Гализо Н.В.* - Биофизика, 1991. Т.36. С.185-189.
5. *Конев С.В., Мажуль В.М.* Межклеточные контакты. Минск. Наука и техника. 1977. 290 с.
6. *Хюльзер Д., Цемпель Т., Ройс Б., Зур Д., Шеровская Ю.Ю. и др.* - Биологические мембраны. 1994. Т.П. С.50-61.
7. *Балаян М.А.* Некоторые структурнофункциональные особенности мембран радиорезистентных бесплазмидных клеток *Salmonella derby*. Канд. дис. 1998, Ереван. 110 с.
8. *Willets N.S.* - Mol. Gen. Genet. 1970. V.108. P.365-373.
9. *Minasyants M.Kh., Badalyan G.G.* - Crystall. Reports. 1997. V.42. P.502-505.
10. *Inoye O.H., Pardce M.B.* - J. Biol. Chem. 1973. V.245. N 3 P.58.
11. *Balayan M.A., Vardevanyan P.O., Pepoyan A.Z. et. al.* - Memb. Cell. Biol. 1998. V.11. N 5. P.623-629.
12. *Пепоян А.З., Овсепян Л.Н., Погосян А.Ю., Овсепян Г.А. и др.* - Биохимия. 1993. Т.58. С.1880-1885.

Ա.Զ. Փեփոյան

Salmonella derby ՈւՄ- զգայուն շտամմների բջջապատերի կառուցվածքային փոփոխությունները և աճը՝ կախված միջավայրի թթվայնությունից

Ուսումնասիրվել է *Salmonella derby* ՈւՄ-զգայուն բջիջների աճը և բջջապատերի կառուցվածքային փոփոխությունները՝ կախված միջավայրի թթվայնությունից և R-պլազմիդի բացակայությունից: Ցույց է տրվել, որ կախված միջավայրի pH -ից *S. derby* պլազմիդակիր և անպլազմիդ բջիջների աճման կինետիկական պարամետրերը փոփոխվում են՝ ենթարկվելով միևնույն կինետիկական օրենքների: Բացահայտվել է *S. derby* բջիջների բջջապատերի կառուցվածքային առանձնահատկությունների կախվածությունը միջավայրի թթվայնությունից: